

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：36301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06119・19K21237

研究課題名(和文)酸棗仁湯の脳由来神経栄養因子(BDNF)産生能のメカニズム解析

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanisms for Sansoninto to produce the brain-derived neurotrophic factor

研究代表者

澤本 篤志(Sawamoto, Atsushi)

松山大学・薬学部・特任助教

研究者番号：70760388

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、酸棗仁湯の脳由来神経栄養因子(BDNF)産生促進作用のメカニズムについて検討した。酸棗仁湯の構成生薬抽出エキスをそれぞれマウス神経芽細胞腫由来の株化細胞Neuro2aに添加すると、サンソウニン抽出エキスによって細胞内PKAシグナルおよび核内転写因子CREBが活性化し、BDNF発現が上昇した。個体レベルでは、サンソウニン抽出エキスを経口投与したマウスは空間作業記憶が向上した。さらに、海馬組織においてPKAシグナルが活性化すること、BDNF発現が上昇することを確認した。以上結果より、酸棗仁湯のBDNF産生促進作用にはサンソウニンによるPKAシグナルの活性化が寄与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

認知症やうつ病などの中枢神経疾患では脳内でのBDNF発現が低下する。報告者はこれまでに、不眠症改善に用いられる漢方方剤「酸棗仁湯」がマウス脳内においてBDNF産生促進作用を発揮することが明らかにしたが、詳細なメカニズムについては不明であった。本研究では、酸棗仁湯の構成生薬(サンソウニン、ブクリョウ、チモ、センキュウ、カンゾウ)のうち、サンソウニン抽出エキスが細胞培養系およびマウス海馬においてPKAシグナル活性化し、BDNF発現を上昇させることを見出した。これらの研究成果は、酸棗仁湯を中枢神経疾患治療薬として臨床応用するためのエビデンス構築に寄与するものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the mechanisms of Sansoninto promoting the production of brain-derived neurotrophic factor (BDNF). When the five constituent herbal extracts were added to Neuro2a cells, the phosphorylation level of protein kinase A (PKA) and cAMP response element binding protein (CREB) were enhanced by jujube seed extraction. Moreover, the protein expression of matureBDNF was also increased. Similar to this results, BDNF production via PKA signal activation was confirmed in mouse hippocampal tissue. These results suggest that the activation of PKA signal by jujube seed contributes to the promotion of BDNF production by Sansoninto.

研究分野：薬理学

キーワード：酸棗仁湯 脳由来神経栄養因子 育薬 海馬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会、ストレス社会といった社会的背景をもつわが国においては、認知症やうつ病などの中枢神経疾患の罹患者数が増加している。認知症やうつ病の発症メカニズムは明らかではないが、近年、脳内の BDNF (脳の“栄養素”のような蛋白質) 発現低下がこれらの疾患に共通する発症要因ではないかと議論されている。BDNF 発現は、加齢に伴う脳血流の悪化や身体的・精神的ストレスの負荷によって低下することから、BDNF 発現低下抑制または発現上昇を促進することはこれらの疾患の予防または治療に役立つと期待される。しかしながら、BDNF 発現レベルを調節するような医薬品は今のところ存在しない。

報告者は、東洋医学における『駆瘀血作用 (身体の血液の循環を改善する作用)』に着目し、駆瘀血剤として使用されている漢方薬に対して *in vitro*, *in vivo* を組み合わせたスクリーニングを行った。その結果、不眠症改善作用を有する“酸棗仁湯”が海馬の BDNF 発現を上昇することを見出し、認知症やうつ病などの疾患予防または治療に有用であることを報告した (Sawamoto et al., J Nat Med, 2018)。本研究では、さらなるエビデンスレベルの向上を目指し、育薬の観点から、酸棗仁湯が有する BDNF 発現上昇作用のメカニズム解明を試みる。

2. 研究の目的

本研究では、育薬の観点から酸棗仁湯構成生薬およびその含有成分に着目し、BDNF 発現上昇作用のメカニズム解明を試みる。これにより、酸棗仁湯を中枢神経疾患治療薬として臨床応用するためのエビデンス構築を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 酸棗仁湯の構成生薬抽出エキスが CREB 活性および BDNF 発現に及ぼす影響の検討

マウス神経芽細胞腫由来の株化細胞 Neuro2a を DMEM Low Glucose (10% FBS) に懸濁し、 2×10^5 cells/mL となるように 6 ウェルプレートに播種し、24 時間培養した。培地を DMEM Low Glucose (2% FBS) に交換し、さらに 24 時間培養した。各構成生薬の抽出エキス (サンソウニン (SSNE)、ブクリョウ (BRE)、センキュウ (SKE)、チモ (TME)、カンゾウ (KZE)) 100 μ g/mL を添加し、10 分後に全細胞溶解液を回収し、ウエスタンブロット法で CREB 活性 (リン酸化) に与える影響について検討した。BDNF 発現に及ぼす影響については、上記と同様の方法で Neuro2a を 24 時間処理し、全細胞溶解液を回収後、ウエスタンブロット法で解析した。

(2) サンソウニン抽出エキス (SSNE) の細胞内シグナル伝達に対する影響の検討

(1) と同様の方法で、サンソウニン抽出エキス (SSNE: 100 μ g/mL) が BDNF 産生に關与する細胞内シグナル伝達に及ぼす影響について検討した。

(3) SSNE が空間作業記憶に及ぼす影響の検討

SSNE (560 mg/kg) をマウス (C57BL/6N, 雄性, 7 週齢) に 16 日間経口投与した。後半の 7 日間は 8 方向放射状迷路を用いて、空間作業記憶課題獲得までの日数および時間を計測した。この試験では、8 つのアームに配置された餌をすべて取り終えるまでの時間、総移動距離、アームへの侵入回数を指標とした。試験終了後に海馬を摘出し、タンパク抽出を行った。ウエスタンブロット法、ELISA 法を用いて、BDNF 発現および PKA シグナルに対する影響について検討した。

4. 研究成果

(1) 酸棗仁湯の構成生薬抽出エキスが CREB 活性および BDNF 発現に及ぼす影響の検討

酸棗仁湯の構成生薬抽出エキスが Neuro2a の CREB 活性に及ぼす影響を検討したところ、SSNE、BRE、SKE 処理によって Neuro2a の CREB 活性 (リン酸化) が有意に亢進した (図 1 A)。また、これらの 3 種類の抽出エキスが BDNF 産生に及ぼす影響について調べたところ、SSNE の効果が最も強かった (図 1 B)。

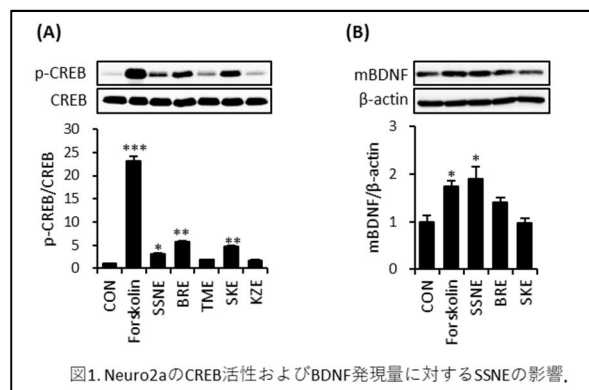


図1. Neuro2aのCREB活性およびBDNF発現量に対するSSNEの影響。

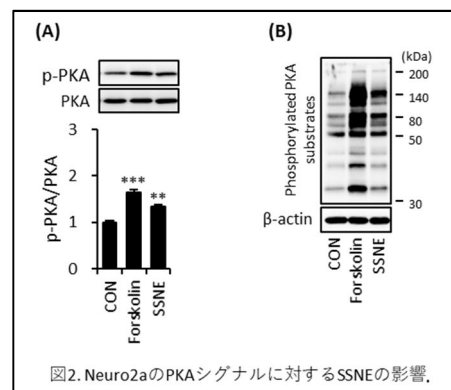


図2. Neuro2aのPKAシグナルに対するSSNEの影響。

(2) SSNE の細胞内シグナル伝達に対する影響の検討

SSNE が BDNF 産生に關与する細胞内シグナル伝達に及ぼす影響について検討したところ、cAMP 依存性プロテインキナーゼ A (PKA) および PKA 基質のリン酸化が有意に亢進していた (図 2 A, B)。一方、プロテインキナーゼ B (Akt)、細胞外シグナル調節キナーゼ (ERK) およびカルシウム

カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼ (CaMK) のリン酸化にはほとんど影響しなかった。

(3) SSNE が空間作業記憶に及ぼす影響の検討

試験開始日(1日目)と試験終了日(7日目)のデータを比較すると、対照群に対して SSNE 投与群では総移動距離, アームへの侵入回数が減少した(図3)。また, 海馬組織における PKA シグナル伝達の亢進(図4A, B), および BDNF 発現の上昇傾向が確認できた(図4C)。

サンソウニン抽出エキス中にはフラボノイド, トリテルペノイドサポニンなどの植物性化学物質が多く含まれることから, これらの化合物に焦点を当て詳細な作用機序解明に取り組んだが, PKA シグナルの活性化を介して BDNF 発現を増加させる化合物の発見には至らなかった。しかしながら本研究では, サンソウニン抽出エキスが細胞培養系およびマウス海馬において PKA シグナルの活性化すること, BDNF 発現の上昇作用を發揮することを示し, 酸棗仁湯の

BDNF 発現上昇作用において, サンソウニンが中心的役割を担うことを明らかにすることができた。さらに詳細なメカニズム解明が必要だが, 本研究成果は酸棗仁湯を中枢神経疾患治療薬として臨床応用するためのエビデンス構築に寄与するものと考えられる。

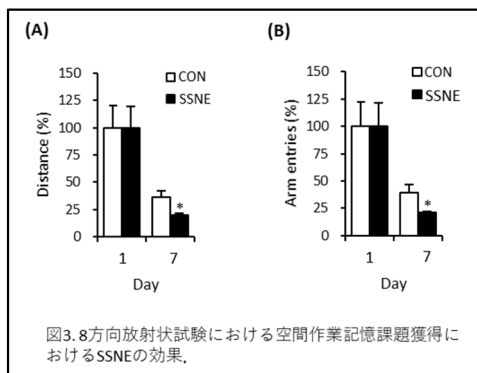


図3. 8方向放射状試験における空間作業記憶課題獲得におけるSSNEの効果。

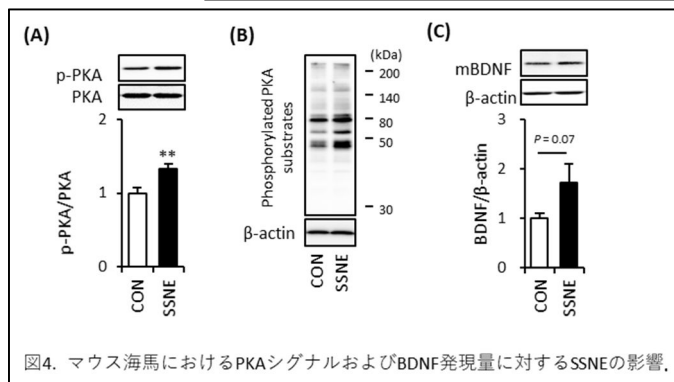


図4. マウス海馬におけるPKAシグナルおよびBDNF発現量に対するSSNEの影響。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 澤本篤志, 福岡正剛, 高本幸治, 天倉吉章, 好村守生, 孕石梨愛, 奥山聡, 古川美子, 中島光業
2. 発表標題 酸棗仁によるBDNF産生促進作用のメカニズム解析
3. 学会等名 日本薬学会第140年会（京都）
4. 発表年 2019年～2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----